

10/15/11796

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関
国際事務局



(43)国際公開日
2003年11月6日 (06.11.2003)

PCT

(10)国際公開番号
WO 03/091430 A1

(51)国際特許分類⁷:
9/04, 1/15, 1/19, 1/21, 5/00

C12N 15/09,

(81)指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(21)国際出願番号:

PCT/JP03/05375

(22)国際出願日:
2003年4月25日 (25.04.2003)

(25)国際出願の言語:

日本語

(26)国際公開の言語:

日本語

(30)優先権データ:
特願2002-125353 2002年4月26日 (26.04.2002) JP

(84)指定国(広域): ARIPO特許(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI特許(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71)出願人および

(72)発明者: 早出 広司 (SODE,Koji) [JP/JP]; 〒152-0013 東京都目黒区南1-13-16 Tokyo (JP).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

(74)代理人: 小林 孝次 (KOBAYASHI,Takashi); 〒171-0022 東京都豊島区南池袋2-47-6 パレス南池袋701号 Tokyo (JP).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

WO 03/091430 A1

(54) Title: GLUCOSE DEHYDROGENASE β -SUBUNIT AND DNA ENCODING THE SAME

(54)発明の名称: グルコース脱水素酵素 β サブユニット及びそれをコードするDNA

(57) Abstract: A DNA fragment encoding the β -subunit is obtained by inverse PCR with the use of a primer designed based on the base sequence of the N-terminal signal sequence region of the β -subunit of GDH originating in *Burkholderia cepacia* KS1 strain.

(57)要約: ブルクホルデリア・セバシアKS1株由来GDHの β サブユニットのN末端シグナル配列領域の塩基配列からデザインしたプライマーを用いたインバースPCRにより、 β サブユニットをコードするDNA断片を得る。

明細書

グルコース脱水素酵素 β サブユニット及びそれをコードするDNA

技術分野

本発明は、グルコース脱水素酵素の β サブユニットを構成するチトクロームC、それをコードするDNA、及びそれらの利用に関する。グルコース脱水素酵素は、酵素電極を用いたグルコースセンサ等に有用である。

背景技術

特定の基質に対して特異的に反応する酵素を用いたバイオセンサの開発は、産業の分野を問わず盛んに行われている。その中でも特にバイオセンサの1つであるグルコースセンサは、主に医療分野で測定方法やその方法を利用した装置の開発が盛んに行われている。例えばグルコースセンサは、1962年にClarkとLyonsによってグルコースオキシダーゼと酸素電極を組み合わせたバイオセンターの報告 (L. C. Clark, J. and Lyons, C. "Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery." Ann. N. Y. Acad. Sci. 105:20-45) が最初にされて以来、約40年ほどの歴史を有している。

このように、グルコースセンサに、酵素としてグルコースオキシダーゼが採用されてからの歴史は長い。なぜならグルコースオキシダーゼは、グルコースに対する基質特異性が高く、熱安定性に優れており、更に酵素の量産化が可能であり、生産コストが他の酵素と比べて安価である、からである。基質特異性が高いということは、酵素がグルコース以外の糖とは反応しないため、測定値に誤差を生じることなく、正確な測定が行なえるという利点に通じる。また、熱安定性に優れているということは、酵素が熱により変性し酵素活性が失活するという問題を防止することができ、長期間正確な測定が行えるという利点に通じる。

しかし、グルコースオキシダーゼは、上記の様なメリットを有している反面、例えば溶存酸素の影響を受け、測定結果に影響があるという問題も有している。

一方、グルコースオキシダーゼ以外には、グルコース脱水素酵素（以下、「グルコースデヒドロゲナーゼ」又は「GDH」ともいう）を利用したグルコースセン

サの開発も行われてきた。そして、酵素も、微生物から発見されている。例えば、バチルス (*Bacillus*) 属由来のグルコースデヒドロゲナーゼ (EC1.1.1.47) 及びクリプトコッカス (*Cryptococcus*) 属由来グルコースデヒドロゲナーゼ (EC1.1.1.119) が知られている。

前者のグルコースデヒドロゲナーゼ (EC1.1.1.47) は、 β -D-グルコース + NAD(P)⁺ → D-δ-グルコノラクトン + NAD(P)H + H⁺の反応を触媒する酵素であり、後者のグルコースデヒドロゲナーゼ (EC1.1.1.119) は、D-グルコース + NADP⁺ → D-δ-グルコノラクトン + NADPH + H⁺の反応を触媒する酵素であり、前述した微生物由来のグルコースデヒドロゲナーゼは、既に市販もされている。

これらグルコースデヒドロゲナーゼは、測定サンプルの溶存酸素の影響を受けないという利点を有する。このことは、酸素分圧が低い環境下で測定を行ったり、酸素量が多く要求される高濃度サンプルを測定する場合であっても、測定結果に誤差を及ぼさずに正確に測定することができるという利点に通じる。

しかし、従来に見られるグルコースデヒドロゲナーゼは、溶存酸素の影響を受けない一方、熱安定性が悪く、基質特異性がグルコースオキシダーゼよりも劣るという問題点を有しており、センサに採用される酵素として、グルコースオキシダーゼやグルコースデヒドロゲナーゼの両欠点を補う酵素の提供が望まれていた。

尚、本発明者は Sode, K., Tsugawa, W., Yamazaki, T., Watanabe, M., Ogasawara, N., and Tanaka, M., (1996) Enzyme Microb. Technol. 19, 82-85. や、 Yamazaki, T., Tsugawa, W., and Sode, K., (1999) Appli Biochemi and Biotec. 77-79/0325 や、 Yamazaki, T., Tsugawa, W., and Sode, K., (1999) Biotec Lett. 21, 199-202において、温泉近くの土壤より採取した試料を用い、GDHについての研究結果を報告している。この試料中の微生物が産出するGDHは補酵素結合型であり、すでに至適反応温度、熱安定性、基質特異性などの酵素学的性質が明らかとなっている（前記文献）。本酵素は高い耐熱性を持つ触媒サブユニット（ α サブユニット）、電子伝達サブユニット（ β サブユニット）、機能不明の γ サブユニットから構成されているヘテロオリゴマー酵素であり、活性のピークを45℃と75℃に持つ。また、 γ 、 α サブユニット遺伝子はクローニングされており、上記微生物がブルクホルデリア・セバシア (*Burkholderia cepacia*) に属すること、及び β サブユニットのN

末端アミノ酸配列も明らかにされている（猪瀬 健、東京農工大学修士論文（2001年））。しかし、 β サブユニット遺伝子の構造は未だ報告されていない。

発明の開示

本発明は、ブルクホルデリア属微生物のGDH β サブユニットをコードするDNA、及びその利用法を提供することを課題とする。

本発明者は、ブルクホルデリア・セパシア KS1株のGDHに関する研究をさらに進め、GDH β サブユニットをコードするDNAを単離することに成功し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は以下のとおりである。

(1) 以下の(A)または(B)に示すタンパク質。

(A) 配列番号16のアミノ酸番号23～425からなるアミノ酸配列を少なくとも有するタンパク質。

(B) 配列番号16のアミノ酸番号23～425からなるアミノ酸配列において、1～20個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、又は付加されたアミノ酸配列を有し、グルコース脱水素酵素 β サブユニットとして機能し得るタンパク質。

(2) 以下の(A)又は(B)のタンパク質をコードするDNA。

(A) 配列番号16のアミノ酸番号23～425からなるアミノ酸配列を少なくとも有するタンパク質。

(B) 配列番号16のアミノ酸番号23～425からなるアミノ酸配列において、1～20個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、又は付加されたアミノ酸配列を有し、グルコース脱水素酵素 β サブユニットとして機能し得るタンパク質。

(3) 以下の(a)又は(b)に示すDNAである(2)に記載のDNA。

(a) 配列番号15の塩基番号187～1398からなる塩基配列を含むDNA。

(b) 配列番号15の塩基番号187～1398からなる塩基配列とストリンジエントな条件下ハイブリダイズし得るDNA。

(4) さらに配列番号15の塩基番号121～187からなる塩基配列を含む

(3)に記載のDNA。

(5) (2)～(4)のいずれかに記載のDNAを含有する組換えベクター。

(6) (2)～(4)のいずれかに記載のDNA又は(5)の組換えベクターで形質転換された形質転換体。

(7) (6)に記載の形質転換体を培養して、前記DNAの発現産物としてグルコース脱水素酵素 β サブユニットを産生させ、これを採取するグルコース脱水素酵素 β サブユニットの製造方法。

(8) さらにブルクホルデリア・セパシアのグルコース脱水素酵素 α サブユニット及び γ サブユニットをコードする塩基配列を含む(3)又は(4)に記載のDNA。

(9) (8)に記載のDNAを含有する組換えベクター。

(10) (8)に記載のDNA又は(9)に記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。

(11) (10)に記載の形質転換体を培養して、前記DNAの発現産物としてグルコース脱水素酵素複合体を産生させ、これを採取するグルコース脱水素酵素複合体の製造方法。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明者らは、ブルクホルデリア・セパシアKS1株のGDH β サブユニットをコードするDNAを検索し、単離した。同菌株は、2000年9月25日に、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター(〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6)に受託番号第FERM BP-7306として寄託されている。本明細書において、GDH β サブユニットをコードするDNAを、本発明のDNA、「 β サブユニット構造遺伝子」又は単に「 β サブユニット遺伝子」ということがある。

本発明者らは、ブルクホルデリア・セパシア KS1株が产生するGDHは、 α サブユニット、 β サブユニット、及び γ サブユニットを含む多量体タンパク質であることを確認している。本発明のタンパク質は、これらのサブユニットのうち、 β サブユニットである。GDHの分光光度解析により、酸化型GDHの吸収波長はグルコ

ノバクター S p. 、アセトバクター s p. のデヒドロゲナーゼチトクローム複合体でできているアルコールデヒドロゲナーゼおよびアルデヒドデヒドロゲナーゼの吸収波長と類似しており、熱処理によりこの吸収は失われる。のことと、下記に示す β サブユニットの有無による GDH の至適反応温度の相違から、 β サブユニットはチトクローム C からなっていることが示唆された。

以下に、上記 GDH の理化学的性質を示す。

①作用：

グルコースの脱水素反応を触媒する。

②還元条件下での SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動において、分子量約 60 kDa と分子量約 43 kDa を示すサブユニットからなる。

③TSK gel G3000SW (東ソー (株) 製) を用いたゲル濾過クロマトグラフィーにおいて、分子量約 380 kDa を示す。

④至適反応温度：

45°C 付近 (Tris-HCl 緩衝液、pH 8.0)。

また、 α サブユニット単独では、以下の理化学的性質を示す。

①' グルコース脱水素酵素活性を有する。

②' 還元条件下での SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動において、分子量約 60 kDa を示す。

③' 至適反応温度：

75°C 付近 (Tris-HCl 緩衝液、pH 8.0)。

β サブユニットは、ブルクホルデリア・セパシア KS1 株の培養物から、GDH 活性を指標として GDH 複合体を精製することにより、他のサブユニットとともに取得することができる。GDH 活性は、公知の GDH の活性測定と同様の方法で測定することができる。具体的には、例えば次のようにして測定することができる。594 μ M の 1-メトキシフェナジンメトサルフェート (mPMS) および 5.94 μ M の 2,6-ジクロロフェノールインドフェノール (DCIP) を含む 10 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) に、酵素試料および基質としてグルコースを基質として加え、37°C でインキュベートする。分光光度計を用いて DCIP の 600 nm における吸光度変化を追跡し、当該

吸光度の減少速度を酵素反応速度とする。

また、本発明により β サブユニットをコードする遺伝子の塩基配列（配列番号15）が明らかにされたので、この塩基配列を有するDNA又は同DNAがコードするアミノ酸配列と同じアミノ酸配列をコードするDNAを適当な宿主で発現させることによっても β サブユニットを製造することができる。配列番号15のオープンリーディングフレーム（ORF）がコードし得るアミノ酸配列を、配列番号16に、示す。タンパク質から決定した β サブユニットのN末端アミノ酸配列は、配列番号16のアミノ酸番号23～38と一致していた。したがって、アミノ酸番号1～22はシグナルペプチドであると推定される。尚、配列番号15及び16において、第1番目のアミノ酸残基はValと記載されているが、Metである可能性が高く、また、翻訳後に脱落している可能性がある。

上記アミノ酸配列についてBLASTによるホモロジー検索を行ったところ、ラルストニア・ソアナセアルム (*Ralstonia solanacearum*) 由来のオキシドレダクターゼ脱水素酵素のシトクロムcサブユニットと65%、グルコノバクター・オキシダンス (*Gluconobacter oxydans*) 由来のソルビトール脱水素酵素のシトクロムcサブユニットと48%、エルビニア・シプリペディイ (*Eriwinia cypripedii*) 由来のグルコン酸脱水素酵素のシトクロームcサブユニットと44%、パントエア・シトレア (*Pantoea citrea*) 由来2-ケトーグルコン酸脱水素酵素のシトクロームcサブユニットと塩基配列レベルで55.7%、アミノ酸レベルで46.4%と、全体にわたって高い相同意を示していた。またこれらのシトクロームcのアミノ酸配列中には、ヘム結合モチーフ（配列番号18）配列が保存されていた。これらのことから、本発明の β サブユニットがチトクロームCであることが示された。

本発明の β サブユニットは、GDHの β サブユニットとして機能し得る限り、配列番号16のアミノ酸番号23～425からなるアミノ酸配列において、1～20個、好ましくは1～10個、より好ましくは1～5個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、又は付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質であってもよい。尚、GDHの β サブユニットとして機能するとは、GDHの酵素活性を損なわずにチトクロームCとして機能することをいう。

本発明のDNAは、上記 β サブユニットをコードするDNAであり、例えばブルクホルデリア・セパシアKS1株から取得することができる。本発明のDNAは、本発明を完成する過程においては、ブルクホルデリア・セパシアKS1株の染色体DNAから単離された。本発明のDNAは、例えば、配列番号13及び14に示す塩基配列を有するプライマーを用い、ブルクホルデリア・セパシアKS1株の染色体DNAを鋳型とするPCRによって、取得することができる。また、本発明によりその塩基配列及び同塩基配列によってコードされるアミノ酸配列が明らかとなつたので、これらの配列に基づいて化学合成することによっても取得することができる。また、前記配列に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプローブとするハイブリダイゼーションによって、ブルクホルデリア・セパシアKS1株の染色体DNAから取得することもできる。また、ブルクホルデリア・セパシアの他の菌株からも、同様にしてバリエントを取得することができる。

本発明のDNAは、配列番号16のアミノ酸番号23～425からなるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするものの他、このアミノ酸配列において、1～20個、好ましくは1～10個、より好ましくは1～5個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつ、GDH β サブユニットとして機能するタンパク質をコードするものであってもよい。

本発明のDNAとしては、具体的には、配列番号15の塩基番号187～1398からなる塩基配列を含むDNAが挙げられる。また本発明のDNAは、配列番号15又はこの配列から調製され得るプローブとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつ、 β サブユニットとして機能し得るタンパク質をコードするDNAであってもよい。ストリンジエントな条件としては、70%、好ましくは80%、より好ましくは90%以上の相同性を有するDNA同士がハイブリダイズする条件、具体的には、1×SSC、0.1%SDS、60℃が挙げられる。

本発明のDNA又は同DNAを含む組換えベクターを保持する形質転換体を培養して、同DNAの発現産物としてGDH β サブユニットを産生させ、これを菌体又は培養液から採取することにより、GDH β サブユニットを製造することができる。その際、本発明のGDH β サブユニットをコードするDNAは、さらに α サブ

ユニットをコードするDNA、又はさらに γ サブユニットをコードするDNAとともに発現させることによって、GDH複合体を製造することができる。 γ サブユニット及び α サブユニットを連続してコードするDNA断片は、配列番号18及び19に示す塩基配列を有するプライマーを用いたPCRによって、取得することができる。

GDH β サブユニット又はGDH複合体を產生させる微生物としては、大腸菌をはじめとする腸内細菌群、シュードモナス属やグルコノバクター属などのグラム陰性細菌、バチルス・サブチリス等のバチルス属細菌をはじめとするグラム陽性細菌、サッカロマイセス・セレビシエ等の酵母、アスペルギルス・ニガー等の糸状菌が挙げられるが、これらに限られず、異種タンパク質生産に適した宿主微生物であれば用いることができる。

本発明のDNAのクローニング又は発現に使用するベクターとしては、宿主微生物内で自律的に増殖し得るプラスミド又はファージから遺伝子組換え用として構築されたものが適している。エシェリヒア・コリ用のベクターとしては、pBR322、pUC18、pUC118、pUC19、pUC119、pTrc99A、pBluescriptあるいはコスミドであるSuperCosIなどが例示される。一旦本発明のDNAのクローニングに使用したベクターより、発現等に適した他の組換えベクターへの移入は、本発明のDNAを保持する組換えベクターから制限酵素やPCR法により同DNAを回収し、他のベクター断片と結合させることにより容易に実施できる。また、これらのベクターによる微生物の形質転換は、例えばエシェリヒア属細菌ではカルシウム処理によるコンピテントセル法、バチルス属細菌ではプロトプラスト法、酵母ではKU法やKUR法、糸状菌ではマイクロマニュピレーション法等の方法によって行うことができる。また、エレクトロポレーション法も広く用いることができる。

宿主微生物への目的組換えベクターの移入の有無についての選択は、目的とするDNAを保持するベクターの薬剤耐性マーカー等を指標とすればよい。例えば、薬剤耐性マーカーに基づく選択培地で生育し、かつGDHを生成する微生物を選択すればよい。

形質転換体の培養形態は、宿主の栄養生理的性質を考慮して培養条件を選択すればよく、多くの場合は液体培養を行う。工業的には通気攪拌培養を行うのが有

利である。

培地の栄養源としては、微生物の培養に通常用いられるものが広く使用され得る。炭素源としては資化可能な炭素化合物であればよく、例えば、グルコース、シュークロース、ラクトース、マルトース、ラクトース、糖蜜、ビルビン酸などが使用される。また、窒素源としては利用可能な窒素化合物であればよく、例えば、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、カゼイン加水分解物、大豆粕アルカリ抽出物などが使用される。その他、リン酸塩、炭酸塩、硫酸塩、マグネシウム、カルシウム、カリウム、鉄、マンガン、亜鉛などの塩類、特定のアミノ酸、特定のビタミンなどが必要に応じて使用される。

培養温度は菌が生育し、本発明のタンパク質を生産する範囲で適宜変更し得るが、好ましくは20～42℃程度である。培養時間は条件によって多少異なるが、GDHが最高収量に達する時期を見計らって適當時機に培養を完了すればよく、通常は12～72時間程度である。培地のpHは菌が発育し、本発明のタンパク質を生産する範囲で適宜変更し得るが、好ましくはpH6.0～9.0程度の範囲である。

培養物中の本発明のタンパク質を生産する菌体を含む培養液をそのまま採取し、利用することもできるが、一般には、常法に従って、本発明のタンパク質が培養液中に存在する場合はろ過、遠心分離などにより、本発明のタンパク質を含有する溶液と微生物菌体と分離した後に利用される。本発明のタンパク質が菌体内に存在する場合には、得られた培養物からろ過または遠心分離などの手段により菌体を採取し、次いで、この菌体を機械的方法またはリソチームなどの酵素的方法で破壊し、また、必要に応じて、EDTA等のキレート剤及び界面活性剤を添加して本発明のタンパク質を可溶化し、水溶液として分離採取する。

上記のようにして得られたタンパク質含有溶液を、例えば減圧濃縮、膜濃縮、さらに硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウムなどの塩析処理、あるいは親水性有機溶媒、例えばメタノール、エタノール、アセトンなどによる分別沈殿法により沈殿せしめればよい。また、加熱処理や等電点処理も有効な精製手段である。その後、吸着剤あるいはゲルろ過剤などによるゲルろ過、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィーを適宜組み合わせることによって精製を行うことにより、精製された本発明のタンパク質を得る

ことができる。

カラムクロマイトグラフィーにより分離、精製し、精製酵素標品を得ることができる。該精製酵素標品は、電気泳動（SDS-PAGE）的に単一のバンドを示す程度に純化されていることが好ましいが、 α サブユニット又は γ サブユニットが含まれていてもよい。

上記のようにして得られた精製酵素を、例えば凍結乾燥、真空乾燥やスプレードライなどにより粉末化して流通させることができるとある。

本発明の β サブユニット及び α サブユニット、もしくは必要に応じてさらに γ サブユニットからなるGDH複合体、又はそれを保持する形質転換体は、グルコースセンサの酵素電極として用いることができる。電極としては、カーボン電極、金電極、白金電極などを用い、この電極上に本発明のGDHを固定化する。固定化方法としては、架橋試薬を用いる方法、高分子マトリックス中に封入する方法、透析膜で被覆する方法、光架橋性ポリマー、導電性ポリマー、酸化還元ポリマーなどがあり、あるいはフェロセンあるいはその誘導体に代表される電子メディエーターとともにポリマー中に固定あるいは電極上に吸着固定してもよく、またこれらを組み合わせて用いてもよい。典型的には、グルタルアルデヒドを用いて本発明のグルコース脱水素酵素をカーボン電極上に固定化した後、アミン基を有する試薬で処理してグルタルアルデヒドをブロッキングする。

グルコースの濃度の測定は、以下のようにして行うことができる。恒温セルに緩衝液を入れ、メディエーターを加えて一定温度に維持する。メディエーターとしては、フェリシアン化カリウム、フェナジンメトサルフェートなどを用いることができる。作用電極として本発明の酵素を固定化した電極を用い、対極（例えば白金電極）および参照電極（例えばAg/AgCl電極）を用いる。カーボン電極に一定の電圧を印加して、電流が定常になった後、グルコースを含む試料を加えて電流の増加を測定する。標準濃度のグルコース溶液により作製したキャリプレーションカーブに従い、試料中のグルコースの濃度を計算することができる。

また、本発明の β サブユニットを含むGDH複合体は、グルコース等の糖類アッセイキットの構成要素とすることができます。典型的には、キットは、GDH複合体に加えて、アッセイに必要な緩衝液、メディエーター、キャリプレーションカ-

ブ作成のためのグルコースなどの標準溶液、ならびに使用の指針を含む。本発明に従う酵素は種々の形態で、例えば、凍結乾燥された試薬として、または適切な保存溶液中の溶液として提供することができる。

実施例

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

参考例 1 ブルクホルデリア・セパシア KS1株GDH α サブユニットをコードする遺伝子の単離

<1>ブルクホルデリア・セパシア KS1株からの染色体DNAの調製

ブルクホルデリア・セパシア KS1株より染色体遺伝子を常法に従って調製した。すなわち、同菌株をTL液体倍地(ポリペプトン 10 g、酵母抽出液 1 g、NaCl 5 g、KH₂PO₄ 2 g、グルコース 5 g；1L、pH 7.2)を用いて、34℃で一晩振盪した。増殖した菌体を遠心分離機により回収した。この菌体を10mM NaCl、20mM Tris-HCl(pH8.0)、1mM EDTA、0.5% SDS、100 μg/mlのプロテイナーゼKを含む溶液に懸濁し、50℃で6時間処理した。ここに等量のフェノールークロロホルムを加えて室温で10分間攪拌した後、遠心分離機により上清を回収した。これに終濃度0.3Mになるように酢酸ナトリウムを加え、2倍量のエタノールを重層して中間層に染色体DNAを析出させた。これをガラス棒を用いてすくいとり、70%エタノールで洗浄した後、適当量のTEバッファーに溶解させ、染色体DNA溶液とした。

<2>GDH α サブユニットのN末端アミノ酸配列の決定

実施例 2 と同様にして精製したGDHを凍結乾燥によって濃縮後、12.5%ポリアクリルアミドを用いたSDS-電気泳動法を用いて展開し、 α サブユニットを分離した。こうして得られた α サブユニットをポリビニリデンフルオリド膜に転写した後、アミノ酸シーケンサー(島津製作所製、PPSQ-10)によりN末端アミノ酸配列の決定を行った。その結果、本酵素には配列番号3のアミノ酸配列においてアミノ酸番号2～12からなる11残基から構成されるペプチド配列を含むことが明らかとなった。

<3> α サブユニットをコードする遺伝子のクローニング

<1>で調製したDNA 1 μ gを制限酵素Sau3AIで限定分解した。これをCIAP(仔ウシ小腸由来アルカリホスファターゼ)処理した。一方、コスミドであるSuperCosI(ストラジーン社から入手)をBamHI処理し、T4 DNAリガーゼにより、SuperCosIに α -15株由来の染色体DNA断片をSau3AIで限定分解して得られたDNA断片を組み込んだ。得られた組換えDNAでエシェリヒア・コリXL-1 Blue MR(ストラジーン社から入手)を形質転換した。形質転換体はSuperCosI上の抗生物質耐性であるネオマイシン耐性およびアンピシリン耐性にしたがって10 μ g/mlのネオマイシンおよび25 μ g/mlのアンピシリンを含むLB寒天培地から選抜した。得られた形質転換体をLB液体培地で培養した。これらの形質転換菌体を集菌後、GDH活性測定試薬に懸濁し、グルコースに対する脱水素酵素活性を指標にクローンを選抜した。その結果、1株のグルコース脱水素酵素活性を示すクローンが得られた。

<4> サブクローニング

<3>で得られた α サブユニットをコードする遺伝子を含むコスミドSuperCosIから、目的遺伝子を含むDNA断片を調製した。同コスミドから挿入遺伝子断片を制限酵素NotIにより切り出した。このDNA断片を制限酵素XbaIで処理し、それらの断片をXbaIで消化したプラスミドpUC18に組み込んだ。各挿入断片を含むプラスミドpUC18でエシェリヒア・コリDH5 α MCR株を形質転換し、アンピシリン50 μ g/mlを含むLB寒天培地で生じるコロニーを採取した。得られた形質転換体を液体のLB培地で培養し、それぞれの細胞のGDH活性を<3>と同様に調べた。その結果、一つの形質転換体にGDH活性を示す株が得られた。この形質転換体からプラスミドを抽出し、その挿入DNA断片を解析したところ、約8.8kbpの挿入断片が確認された。本プラスミドをpKS1と命名した。

<5> 塩基配列の決定

pKS1の挿入DNA断片について、制限酵素解析及び常法に従い塩基配列を決定した。その結果、本挿入DNA断片中に、<2>で明かとなった α サブユニットのN末端アミノ酸配列をコードするDNA配列が確認され、この配列を含むオープンリーディングフレームが見つかった。決定した塩基配列および同塩基配列がコードし

得るアミノ酸配列は、配列番号1および3に示す通りである。尚、後述するように、配列番号1の塩基配列のうち、塩基番号2386以降の塩基配列は、配列番号4に示すアミノ酸配列をコードしており、 β -サブユニットをコードしていると推定された。

参考例2 組換え大腸菌によるGDH α サブユニットの生産

α サブユニットの塩基配列が決定されたことにより、前記 α サブユニットの構造遺伝子を用いてベクターを作製し、更に前記ベクターにより形質転換体の製造を行った。

先ずベクターに挿入する遺伝子を以下のように調製した。

K S 1 株由来のゲノム断片をテンプレートとして、所望の制限酵素部位を含むよう、PCR反応により増幅した。PCR反応には次の1組のオリゴヌクレオチドプライマーを用いた。

(フォワード)

5'-CCCAAGCTTGGGCCGATACCGATAACGCA-3' (配列番号5)

(リバース)

5'-GAGAAGCTTCGCACGGTCAGACTTCC-3' (配列番号6)

PCRにより増幅された遺伝子を制限酵素HindIIIで消化した後、発現ベクターpFLAG-CTS(SIGMA社)のクローニング部位であるHindIII部位に挿入した。得られたプラスミドをpFLAG-CTS/ α と命名した。

前記プラスミドpFLAG-CTS/ α でエッシェリヒア・コリDH5 α M C R株を形質転換し、アンピシリン50 μ g/m1を含むLB寒天培地で生じるコロニーを採取した。

さらにp K S 1挿入断片について、 α サブユニットの上流に関してオープンリーディングフレームを検索したところ、新たに配列番号2に記載される168アミノ酸残基から構成されるポリペプチドをコードする507塩基から構成される構造遺伝子(配列番号1中塩基番号258~761)が見出された。この構造遺伝子は、 γ サブユニットをコードしていると考えられた。

α サブユニットのコード領域の上流に、 γ サブユニットをコードする領域の存在が明らかになったことから、 γ サブユニットと α サブユニットが連続するポリシストロン構造の遺伝子を含む組換えベクターを作製し、同ベクターを導入した形質転換体を構築した。

先ずベクターに挿入する遺伝子を以下のように調製した。

γ サブユニットの構造遺伝子および α サブユニットの構造遺伝子が連続するKS1株由来のゲノム断片をテンプレートとして、所望の制限酵素部位を含むようPCR反応により増幅した。PCR反応には次の1組のオリゴヌクレオチドプライマーを用いた。

(フォワード)

5'-CATGCCATGGCACACAAACGACAA γ ACT-3' (配列番号7)

(リバース)

5'-CCCAAGCTTGGGTCA γ GACTTCCTTCTTCAGC-3' (配列番号8)

このPCRにより増幅された遺伝子の5'末端をNcoI、3'末端をHindIIIで消化した後、ベクターpTrc99A (Pharmacia社) のクローニング部位である、NcoI/HindIIIに挿入した。得られたプラスミドをpTrc99A/ $\gamma+\alpha$ と命名した。

前記プラスミドpTrc99A/ $\gamma+\alpha$ により、エシェリヒア・コリDH5 α MCR株を形質転換し、アンピシリン50 μ g/mlを含むLB寒天培地で生じるコロニーを採取した。

前記pKS1、pFLAG-CTS/ α 、pTrc99A/ $\gamma+\alpha$ のそれぞれのプラスミドによって形質転換したエシェリヒア・コリDH5 α MCR株を用いて α サブユニットの生産を行った。各形質転換体をアンピシリン50 μ g/mlを含むLB培地3mlに植菌し、37℃で12時間培養を行い、遠心分離機により細胞を集菌した。この細胞をフレンチプレス(1500kgf)で破碎した後、超遠心(4℃、160,400×g、90分)により膜画分(10mMリン酸カリウム緩衝液pH6.0)を分離した。

参考例 3 GDH活性の確認

先ず前記各膜分画を用いてGDH活性の確認を行った。具体的には594 μ Mのメ

チルフェナジンメトサルフェート(mPMS)および $5.94\mu M$ の2,6-ジクロロフェノールインドフェノール(DCIP)を含む10mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.0)により、目視判定を行った。結果は以下のとおりである。+の数は、青色から無色への変化の程度を表す。

pFLAG-CTS/αによる形質転換体培養膜分画	+
pKS1による形質転換体培養膜分画	++
pTrc99A/γ+αによる形質転換体培養膜分画	+++

αサブユニットのみを組みこんだpFLAG-CTS/αによる形質転換体培養膜分画のGDH活性が最も低く、効率良くベクターを構築したpTrc99A/γ+αによる形質転換体培養膜分画が最も高いGDH活性を示した。

αサブユニットの構造遺伝子のみによるベクターを用いた形質転換体でもαサブユニットは発現されるが、更にγサブユニットの構造遺伝子をαサブユニットの構造遺伝子と合わせたベクターを用いることにより、効率良くαサブユニットを得ることができた。

本発明のグルコース脱水素酵素を用いてグルコースをアッセイした。本発明のグルコース脱水素酵素(αサブユニット)を、各種濃度のグルコースで酵素活性を測定した。GDH活性の測定は $594\mu M$ のメチルフェナジンメトサルフェート(mPMS)および $5.94\mu M$ の2,6-ジクロロフェノールインドフェノール(DCIP)を含む10mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.0)の中で行った。酵素試料および基質としてグルコースを基質として加え37°Cでインキュベートした時のDCIPの600nmの吸光度変化を分光光度計を用いて追跡し、その吸光度の減少速度を酵素反応速度とした。本発明のGDHを用いて、0.01~1.0mMの範囲でグルコースの定量を行うことができた。

実施例1 ブルクホルデリア・セパシア KS1株GDH βサブユニットをコードする遺伝子の単離

<1>ブルクホルデリア・セパシア KS1株GDH βサブユニットの検索

Sanger Centre のブルクホルデリア・セパシアJ2315株ゲノムデータベース(<http://www.sanger.ac.uk/>)を用いて、KS1株由来GDHのβサブユニット遺伝子を検

索した。すでに明らかにされているKS1株GDH β サブユニットのN末端配列（配列番号9）を参考に、アセトバクターS p.、グルコノバクターS p.由来のアルコール脱水素酵素（Tamaki T. et al., Biochim Biophys Acta 1088(2):292-300 (1991)、Matsushita K., et al., Biosci. Biotech. Biochem., 56, 304-310 (1992)、Takemura H., et al., J Bacteriol, 175, 6857-66 (1993)、Kondo K. et al., Appl Environ Microbiol, 63, 1131-8 (1997)）、エルビニアs p.、シードモナスs p.由来のグルコン酸脱水素酵素（Yum DY, et al., J Bacteriol, 179, 6566-72, (1997)、Matsushita K. et al., J Biochem, 85, 1173-81 (1979)）、グルコノバイター s p.由来のソルビトール脱水素酵素（Choi, E.S., et al., FEMS Microbiol. Lett., 125, 45-50 (1995)）、エルビニアs p.、パントエアs p.由来の2-ケトグルコン酸脱水素酵素（Pujol CJ et al., J Bacteriol, 182, 2230-7, (2000)）のシトクロームcサブユニットとホモロジーの高いアミノ酸配列（配列番号10）をデザインした。

上記アミノ酸配列を指標として、前記ブルクホルデリア・セパシアJ2315株のデーターベースからBLASTを用いてホモロジーの高いアミノ酸配列をコードしている遺伝子配列を検索した。つぎに、得られた5つの配列に対して、KS1株GDH α サブユニットのC末端配列とのホモロジーを検索した結果、2つの遺伝子断片から翻訳されるアミノ酸配列が高いホモロジー(>90%)を示した。各遺伝子断片は200~500bpと短かったので、これらの配列に対して相同性の高い配列を、Blas tを用いてブルクホルデリア・セパシアJ2315株のゲノムデーターベースから検索し、各断片をつなぎ合わせた。その結果、3110bpの断片を得た。得られた塩基配列にはGDHのC末端と思われるORFと1275bpからなるシトクロームc構造遺伝子と思われるORFが存在した（配列番号11）。同ORFがコードするアミノ酸配列を配列番号12に示す。得られたJ2315株の塩基配列と既にクローニングされているKS1株 α サブユニット塩基配列を比較した結果、 α サブユニット下流にはJ2315株シトクロームcのシグナルペプチドをコードする塩基配列に相同性の高い塩基配列が含まれていた。

以上のことから、参考例1で得られたブルクホルデリア・セパシアKS1株のクローニング断片中の三番目のORF（配列番号1の塩基番号2386以降）は、 β

ーサブユニットをコードしていると推定された。また、精製された β -サブユニットのN末端におけるアミノ酸配列と、配列番号1中の塩基番号2452～2466の塩基配列によって翻訳される5アミノ酸残基が一致したことからも、前記ORFは β サブユニットをコードしていると考えられた。

<2>インバースPCR法を用いた β サブユニット構造遺伝子の增幅

(1) 菌体の培養及びゲノムの抽出

KS1株を5mlの完全培地(0.5% polypeptone、0.3% yeast extract、0.5% NaCl)を用いて37℃で一晩振とう培養した。得られた菌体からGennomicPrep™ Cells and Tissue DNA Isolation Kit(Amersham Pharmacia Biotech社)を用いてゲノムを抽出した。方法は付属のマニュアルに従った。得られたゲノムに対してフェノール/クロロホルム処理を行い、エタノール沈殿させた後、精製水に溶解した。

(2) ゲノム断片の環状化

KS1株より抽出したゲノムを、BamHI、EcoRI、HindIII、SmaI、SacIおよびXbaIで消化し、エタノール沈殿によってゲノム断片を回収した。制限酵素消化したゲノム1μgをDNAライゲーションキット(宝酒造(株))を用いて16℃で一晩ライゲーション反応を行った。

(3) PCR

KS1株GDH β サブユニットのN末端シグナル配列領域の塩基配列からデザインしたフォワードプライマー(EF1配列番号13)50pmol、リバースプライマー(ER1配列番号14)50pmol(プライマーはいずれもInvitrogen社に依託合成)、LATAq(宝バイオ(株))0.5ml、dNTP溶液8μl、10×PCR buffer 5μlに精製水を全量50μlとなるように加え、プログラムテンプレートコントロールシステムPC-801(ASTEC)を用いてPCRを行った。PCRの反応は、以下の条件で行った。94℃ 5分、98℃ 20秒、62℃ 30秒を30サイクルの後、72℃ 6分、72℃ 10分。

SmaIで制限酵素消化したゲノムをテンプレートとした場合において、約2.1kbpの大きさの断片がアガロース電気泳動で確認された。

<3>PCR増幅断片のシークエンシング

(1) TAクローニング

前記のインバースPCR産物をアガロースゲル電気泳動後、バンドを切り出し、Gene clean II KIT (Bio101 inc.) を用いて精製した。この断片を、pGEMR-T and pGEMR-T EASY Vector Systems (Promega) を用いて、pGEM-T Vectorにライゲーションした。ライゲーションを行ったベクターでエシェリヒア・コリDH5 α を形質転換し、アンピシリン 50 μ g/ml、X-Gal 40 μ g/ml、IPTG 0.1 μ Mを含むL寒天培地を用いて一晩培養した。出現したコロニーから白色のコロニーを選択し、アンピシリン50 μ g/mlを含むL培地で一晩培養して、菌体からプラスドをアルカリ法により抽出した。

(2) シークエンスサンプルの調製

得られたプラスミドをRNase処理し、これに0.6倍量の20% PEG6000/2.5M NaClを加え、氷上に1時間放置した。その後15000r.p.m.、4°Cで15分間遠心分離し、ペレットを得た。これを70%エタノールで洗浄し、ペレットを真空乾燥させた。これを精製水に溶解した。

(3) DNA塩基配列の解析

(2) で得られたプラスミドの挿入断片の塩基配列を、ABI PRISM™310 Genetic Analyzer (PERKIN-ELMER Applied Biosystems)を用いて解析した。ベクターのマルチクローニングサイトからM13プライマーを用いて挿入断片の一部の配列を決定した結果、これまでに解析されている β サブユニットN末端を含む塩基配列が確認された。この配列を手がかりにプライマーを順次作製して用い、挿入断片の塩基配列を決定した。結果を配列番号15に示す。また、この塩基配列に含まれるORFがコードするアミノ酸配列を配列番号16に示す。

β サブユニットは、全部で425個のアミノ酸残基から構成されており、すでに得られているN末端アミノ酸配列と比較して、そのうち22残基はシグナルペプチドであると考えらる。アミノ酸配列から計算される分子量は45,276Daであり、シグナルペプチドを除いた分子量42,731Daは、SDS-PAGEから求められたKS1株GDH β サブユニットの分子量43kDaとほぼ同等の値であった。 β サブユニットのアミノ

酸配列中には、シトクロームcにおいてヘムとの結合モチーフ（配列番号18）が3ヶ所に確認された。このORFは α サブユニット構造遺伝子のORFのすぐ下流に位置し、開始コドンの上流にSD配列と思われる配列が存在した。

得られたアミノ酸配列についてBLASTによるホモロジー検索を行ったところ、ラルストニア・ソアナセアルム (*Ralstonia solanacearum*) 由来のオキシドレダクターゼ脱水素酵素のシトクロムcサブユニットと65%、グルコノバクター・オキシダンス (*Gluconobacter oxydans*) 由来のソルビトール脱水素酵素のシトクロムcサブユニットと48%、エルビニア・シプリペディイ (*Eriwinia cypripedii*) 由来のグルコン酸脱水素酵素のシトクロームcサブユニットと44%、パントエア・シトレア (*Pantoea citrea*) 由来2-ケトグルコン酸脱水素酵素のシトクロームcサブユニットとアミノ酸レベルで46.4%と、全体にわたって高い相同意を示していた。またこれらのシトクロームcのアミノ酸配列中には、ヘム結合モチーフ（配列番号18）配列が保存されていた。

尚、KS1株のGDH β サブユニット構造遺伝子は、J2315株のGDH β サブユニット構造遺伝子と、塩基配列レベルで92.0%、アミノ酸レベルで92.2%の相同意を有している。

産業上の利用の可能性

本発明により、ブルクホルデリア属微生物のGDH β サブユニット及びそれをコードするDNAが提供される。

請求の範囲

1. 以下の（A）または（B）に示すタンパク質。

（A）配列番号16のアミノ酸番号23～425からなるアミノ酸配列を少なくとも有するタンパク質。

（B）配列番号16のアミノ酸番号23～425からなるアミノ酸配列において、1～20個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、又は付加されたアミノ酸配列を有し、グルコース脱水素酵素 β サブユニットとして機能し得るタンパク質。

2. 以下の（A）又は（B）のタンパク質をコードするDNA。

（A）配列番号16のアミノ酸番号23～425からなるアミノ酸配列を少なくとも有するタンパク質。

（B）配列番号16のアミノ酸番号23～425からなるアミノ酸配列において、1～20個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、又は付加されたアミノ酸配列を有し、グルコース脱水素酵素 β サブユニットとして機能し得るタンパク質。

3. 以下の（a）又は（b）に示すDNAである請求項2に記載のDNA。

（a）配列番号15の塩基番号187～1398からなる塩基配列を含むDNA。

（b）配列番号15の塩基番号187～1398からなる塩基配列とストリンジエントな条件下でハイブリダイズし得るDNA。

4. さらに配列番号15の塩基番号121～187からなる塩基配列を含む請求項3に記載のDNA。

5. 請求項2～4のいずれか一項に記載のDNAを含有する組換えベクター。

6. 請求項2～4のいずれか一項に記載のDNA又は請求項5に記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。

7. 請求項6に記載の形質転換体を培養して、前記DNAの発現産物としてグルコース脱水素酵素 β サブユニットを產生させ、これを採取するグルコース脱水素酵素 β サブユニットの製造方法。

8. さらにブルクホルデリア・セバシアのグルコース脱水素酵素 α サブユニット及び γ サブユニットをコードする塩基配列を含む請求項3又は4に記載のDN

A.

9. 請求項 8 に記載のDNAを含有する組換えベクター。
10. 請求項 8 に記載のDNA又は請求項 9 に記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。
11. 請求項 10 に記載の形質転換体を培養して、前記DNAの発現産物としてグルコース脱水素酵素複合体を産生させ、これを採取するグルコース脱水素酵素複合体の製造方法。

2/18

cac ggc gac gca gcc gca tca ggc atc acg cgg cgt caa tgg ttg caa	338
His Gly Asp Ala Ala Ala Ser Gly Ile Thr Arg Arg Gln Trp Leu Gln	
15 20 25	
ggc gcg ctg gcg ctg acc gca gcg ggc ctc acg ggt tcg ctg aca ttg	386
Gly Ala Leu Ala Leu Thr Ala Ala Gly Leu Thr Gly Ser Leu Thr Leu	
30 35 40	
cgg gcg ctt gca gac aac ccc ggc act gcg ccg ctc gat acg ttc atg	434
Arg Ala Leu Ala Asp Asn Pro Gly Thr Ala Pro Leu Asp Thr Phe Met	
45 50 55	
acg ctt tcc gaa tcg ctg acc ggc aag aaa ggg ctc agc cgc gtg atc	482
Thr Leu Ser Glu Ser Leu Thr Gly Lys Lys Gly Leu Ser Arg Val Ile	
60 65 70 75	
ggc gag cgc ctg ctg cag gcg ctg cag aag ggc tcg ttc aag acg gcc	530
Gly Glu Arg Leu Leu Gln Ala Leu Gln Lys Gly Ser Phe Lys Thr Ala	
80 85 90	
gac agc ctg ccg cag ctc gcc ggc gcg ctc gcg tcc ggt tcg ctg acg	578
Asp Ser Leu Pro Gln Leu Ala Gly Ala Leu Ala Ser Gly Ser Leu Thr	
95 100 105	
cct gaa cag gaa tcg ctc gca ctg acg atc ctc gag gcc tgg tat ctc	626
Pro Glu Gln Glu Ser Leu Ala Leu Thr Ile Leu Glu Ala Trp Tyr Leu	
110 115 120	
ggc atc gtc gac aac gtc gtg att acg tac gag gaa gca tta atg ttc	674
Gly Ile Val Asp Asn Val Val Ile Thr Tyr Glu Glu Ala Leu Met Phe	
125 130 135	
ggc gtc gtg tcc gat acg ctc gtg atc cgt tcg tat tgc ccc aac aaa	722
Gly Val Val Ser Asp Thr Leu Val Ile Arg Ser Tyr Cys Pro Asn Lys	
140 145 150 155	
ccc ggc ttc tgg gcc gac aaa ccg atc gag agg caa gcc tg atg gcc	769
Pro Gly Phe Trp Ala Asp Lys Pro Ile Glu Arg Gln Ala Met Ala	
160 165 170	
gat acc gat acg caa aag gcc gac gtc gtc gtc gtt gga tcg ggt gtc	817
Asp Thr Asp Thr Gln Lys Ala Asp Val Val Val Val Gly Ser Gly Val	
175 180 185	
gcg ggc gcg atc gtc gcg cat cag ctc gcg atg gcg ggc aag gcg gtg	865
Ala Gly Ala Ile Val Ala His Gln Leu Ala Met Ala Gly Lys Ala Val	
190 195 200	
atc ctc gtc gaa gcg ggc ccg cgc atg ccg cgc tgg gaa atc gtc gag	913
Ile Leu Leu Glu Ala Gly Pro Arg Met Pro Arg Trp Glu Ile Val Glu	
205 210 215	
cgc ttc cgc aat cag ccc gac aag atg gac ttc atg gcg ccg tac ccg	961
Arg Phe Arg Asn Gln Pro Asp Lys Met Asp Phe Met Ala Pro Tyr Pro	
220 225 230	
tcg agc ccc tgg gcg ccg cat ccc gag tac ggc ccg ccg aac gac tac	1009

3/18

Ser Ser Pro Trp Ala Pro His Pro Glu Tyr Gly Pro Pro Asn Asp Tyr
 235 240 245 250
 ctg atc ctg aag ggc gag cac aag ttc aac tcg cag tac atc cgc gcg 1057
 Leu Ile Leu Lys Gly Glu His Lys Phe Asn Ser Gln Tyr Ile Arg Ala
 255 260 265
 gtg ggc ggc acg acg tgg cac tgg gcc gcg tcg gcg tgg cgc ttc att 1105
 Val Gly Gly Thr Thr Trp His Trp Ala Ala Ser Ala Trp Arg Phe Ile
 270 275 280
 ccg aac gac ttc aag atg aag agc gtg tac ggc gtc ggc cgc gac tgg 1153
 Pro Asn Asp Phe Lys Met Lys Ser Val Tyr Gly Val Gly Arg Asp Trp
 285 290 295
 ccg atc cag tac gac gat ctc gag ccg tac tat cag cgc gcg gag gaa 1201
 Pro Ile Gln Tyr Asp Asp Leu Glu Pro Tyr Tyr Gln Arg Ala Glu Glu
 300 305 310
 gag ctc ggc gtg tgg ggc ccg ggc ccc gag gaa gat ctg tac tcg ccg 1249
 Glu Leu Gly Val Trp Gly Pro Gly Pro Glu Glu Asp Leu Tyr Ser Pro
 315 320 325 330
 cgc aag cag ccg tat ccg atg ccg ccg ctg ccg ttg tcg ttc aac gag 1297
 Arg Lys Gln Pro Tyr Pro Met Pro Pro Leu Pro Leu Ser Phe Asn Glu
 335 340 345
 cag acc atc aag acg gcg ctg aac aac tac gat ccg aag ttc cat gtc 1345
 Gln Thr Ile Lys Thr Ala Leu Asn Asn Tyr Asp Pro Lys Phe His Val
 350 355 360
 gtg acc gag ccg gtc gcg cgc aac agc ccg ccg tac gac ggc cgc ccg 1393
 Val Thr Glu Pro Val Ala Arg Asn Ser Arg Pro Tyr Asp Gly Arg Pro
 365 370 375
 act tgt tgc ggc aac aac tgc atg ccg atc tgc ccg atc ggc gcg 1441
 Thr Cys Cys Gly Asn Asn Cys Met Pro Ile Cys Pro Ile Gly Ala
 380 385 390
 atg tac aac ggc atc gtg cac gtc gag aag gcc gaa cgc gcc ggc gcg 1489
 Met Tyr Asn Gly Ile Val His Val Glu Lys Ala Glu Arg Ala Gly Ala
 395 400 405 410
 aag ctg atc gag aac gcg gtc gtc tac aag ctc gag acg ggc ccg gac 1537
 Lys Leu Ile Glu Asn Ala Val Val Tyr Lys Leu Glu Thr Gly Pro Asp
 415 420 425
 aag cgc atc gtc gcg gcg ctc tac aag gac aag acg ggc gcc gag cat 1585
 Lys Arg Ile Val Ala Ala Leu Tyr Lys Asp Lys Thr Gly Ala Glu His
 430 435 440
 cgc gtc gaa ggc aag tat ttc gtg ctc gcc gcg aac ggc atc gag acg 1633
 Arg Val Glu Gly Lys Tyr Phe Val Leu Ala Ala Asn Gly Ile Glu Thr
 445 450 455
 ccg aag atc ctg ctg atg tcc gcg aac cgc gat ttc ccg aac ggt gtc 1681
 Pro Lys Ile Leu Leu Met Ser Ala Asn Arg Asp Phe Pro Asn Gly Val

4/18

460	465	470	
gcg aac agc tcg gac atg gtc ggc cgc aac ctg atg gac cat ccg ggc Ala Asn Ser Ser Asp Met Val Gly Arg Asn Leu Met Asp His Pro Gly			1729
475	480	485	490
acc ggc gtg tcg ttc tat gcg agc gag aag ctg tgg ccg ggc cgc ggc Thr Gly Val Ser Phe Tyr Ala Ser Glu Lys Leu Trp Pro Gly Arg Gly			1777
495	500	505	
ccg cag gag atg acg tcg ctg atc ggt ttc cgc gac ggt ccg ttc cgc Pro Gln Glu Met Thr Ser Leu Ile Gly Phe Arg Asp Gly Pro Phe Arg			1825
510	515	520	
gcg acc gaa gcg gcg aag aag atc cac ctg tcg aac ctg tcg cgc atc Ala Thr Glu Ala Ala Lys Lys Ile His Leu Ser Asn Leu Ser Arg Ile			1873
525	530	535	
gac cag gag acg cag aag atc ttc aag gcc ggc aag ctg atg aag ccc Asp Gln Glu Thr Gln Lys Ile Phe Lys Ala Gly Lys Leu Met Lys Pro			1921
540	545	550	
gac gag ctc gac gcg cag atc cgc gac cgt tcc gca cgc tac gtg cag Asp Glu Leu Asp Ala Gln Ile Arg Asp Arg Ser Ala Arg Tyr Val Gln			1969
555	560	565	570
ttc gac tgc ttc cac gaa atc ctg ccg caa ccc gag aac cgc atc gtg Phe Asp Cys Phe His Glu Ile Leu Pro Gln Pro Glu Asn Arg Ile Val			2017
575	580	585	
ccg agc aag acg gcg acc gat gcg atc ggc att ccg cgc ccc gag atc Pro Ser Lys Thr Ala Thr Asp Ala Ile Gly Ile Pro Arg Pro Glu Ile			2065
590	595	600	
acg tat gcg atc gac gac tac gtg aag cgc ggc ggc gcg cat acg cgc Thr Tyr Ala Ile Asp Asp Tyr Val Lys Arg Gly Ala Ala His Thr Arg			2113
605	610	615	
gag gtc tac gcg acc gcc gcg aag gtg ctc ggc ggc acg gac gtc gtg Glu Val Tyr Ala Thr Ala Ala Lys Val Leu Gly Gly Thr Asp Val Val			2161
620	625	630	
ttc aac gac gaa ttc gcg ccg aac aat cac atc acg ggc tcg acg atc Phe Asn Asp Glu Phe Ala Pro Asn Asn His Ile Thr Gly Ser Thr Ile			2209
635	640	645	650
atg ggc gcc gat gcg cgc gac tcc gtc gtc gac aag gac tgc cgc acg Met Gly Ala Asp Ala Arg Asp Ser Val Val Asp Lys Asp Cys Arg Thr			2257
655	660	665	
ttc gac cat ccg aac ctg ttc att tcg acg acg gcg acg atg ccg acc Phe Asp His Pro Asn Leu Phe Ile Ser Ser Ala Thr Met Pro Thr			2305
670	675	680	
gtc ggt acc gta aac gtg acg ctg acg atc gcc gcg ctc gcg ctg cgg Val Gly Thr Val Asn Val Thr Leu Thr Ile Ala Ala Leu Ala Leu Arg			2353
685	690	695	

5/18

atg tcg gac acg ctg aag aag gaa gtc tgacc gtg cggttggaaa tct act ctc 2403
 Met Ser Asp Thr Leu Lys Lys Glu Val Val Arg Lys Ser Thr Leu
 700 705 710
 act ttc ctc atc gcc ggc tgc ctc gcg ttg ccg ggc ttc gcg cgc gcg 2451
 Thr Phe Leu Ile Ala Gly Cys Leu Ala Leu Pro Gly Phe Ala Arg Ala
 715 720 725
 gcc gat gcg gcc gat c 2467
 Ala Asp Ala Ala Asp
 730

<210> 2
<211> 168
<212> PRT
<213> Burkholderia cepacia

<400> 2
 Met His Asn Asp Asn Thr Pro His Ser Arg Arg His Gly Asp Ala Ala
 1 5 10 15
 Ala Ser Gly Ile Thr Arg Arg Gln Trp Leu Gln Gly Ala Leu Ala Leu
 20 25 30
 Thr Ala Ala Gly Leu Thr Gly Ser Leu Thr Leu Arg Ala Leu Ala Asp
 35 40 45
 Asn Pro Gly Thr Ala Pro Leu Asp Thr Phe Met Thr Leu Ser Glu Ser
 50 55 60
 Leu Thr Gly Lys Lys Gly Leu Ser Arg Val Ile Gly Glu Arg Leu Leu
 65 70 75 80
 Gln Ala Leu Gln Lys Gly Ser Phe Lys Thr Ala Asp Ser Leu Pro Gln
 85 90 95
 Leu Ala Gly Ala Leu Ala Ser Gly Ser Leu Thr Pro Glu Gln Glu Ser
 100 105 110
 Leu Ala Leu Thr Ile Leu Glu Ala Trp Tyr Leu Gly Ile Val Asp Asn
 115 120 125
 Val Val Ile Thr Tyr Glu Glu Ala Leu Met Phe Gly Val Val Ser Asp
 130 135 140
 Thr Leu Val Ile Arg Ser Tyr Cys Pro Asn Lys Pro Gly Phe Trp Ala
 145 150 155 160
 Asp Lys Pro Ile Glu Arg Gln Ala
 165

<210> 3
<211> 539
<212> PRT
<213> Burkholderia cepacia

6/18

<400> 3

Met Ala Asp Thr Asp Thr Gln Lys Ala Asp Val Val Val Val Gly Ser
1 5 10 15
Gly Val Ala Gly Ala Ile Val Ala His Gln Leu Ala Met Ala Gly Lys
20 25 30
Ala Val Ile Leu Leu Glu Ala Gly Pro Arg Met Pro Arg Trp Glu Ile
35 40 45
Val Glu Arg Phe Arg Asn Gln Pro Asp Lys Met Asp Phe Met Ala Pro
50 55 60
Tyr Pro Ser Ser Pro Trp Ala Pro His Pro Glu Tyr Gly Pro Pro Asn
65 70 75 80
Asp Tyr Leu Ile Leu Lys Gly Glu His Lys Phe Asn Ser Gln Tyr Ile
85 90 95
Arg Ala Val Gly Gly Thr Thr Trp His Trp Ala Ala Ser Ala Trp Arg
100 105 110
Phe Ile Pro Asn Asp Phe Lys Met Lys Ser Val Tyr Gly Val Gly Arg
115 120 125
Asp Trp Pro Ile Gln Tyr Asp Asp Leu Glu Pro Tyr Tyr Gln Arg Ala
130 135 140
Glu Glu Glu Leu Gly Val Trp Gly Pro Gly Pro Glu Glu Asp Leu Tyr
145 150 155 160
Ser Pro Arg Lys Gln Pro Tyr Pro Met Pro Pro Leu Pro Leu Ser Phe
165 170 175
Asn Glu Gln Thr Ile Lys Thr Ala Leu Asn Asn Tyr Asp Pro Lys Phe
180 185 190
His Val Val Thr Glu Pro Val Ala Arg Asn Ser Arg Pro Tyr Asp Gly
195 200 205
Arg Pro Thr Cys Cys Gly Asn Asn Asn Cys Met Pro Ile Cys Pro Ile
210 215 220
Gly Ala Met Tyr Asn Gly Ile Val His Val Glu Lys Ala Glu Arg Ala
225 230 235 240
Gly Ala Lys Leu Ile Glu Asn Ala Val Val Tyr Lys Leu Glu Thr Gly
245 250 255
Pro Asp Lys Arg Ile Val Ala Ala Leu Tyr Lys Asp Lys Thr Gly Ala
260 265 270
Glu His Arg Val Glu Gly Lys Tyr Phe Val Leu Ala Ala Asn Gly Ile
275 280 285
Glu Thr Pro Lys Ile Leu Leu Met Ser Ala Asn Arg Asp Phe Pro Asn
290 295 300
Gly Val Ala Asn Ser Ser Asp Met Val Gly Arg Asn Leu Met Asp His
305 310 315 320
Pro Gly Thr Gly Val Ser Phe Tyr Ala Ser Glu Lys Leu Trp Pro Gly

7/18

325	330	335
Arg Gly Pro Gln Glu Met Thr Ser Leu Ile Gly Phe Arg Asp	Gly Pro	
340	345	350
Phe Arg Ala Thr Glu Ala Ala Lys Lys Ile His Leu Ser Asn	Leu Ser	
355	360	365
Arg Ile Asp Gln Glu Thr Gln Lys Ile Phe Lys Ala Gly Lys	Leu Met	
370	375	380
Lys Pro Asp Glu Leu Asp Ala Gln Ile Arg Asp Arg Ser Ala	Arg Tyr	
385	390	395
Val Gln Phe Asp Cys Phe His Glu Ile Leu Pro Gln Pro Glu Asn	Arg	
405	410	415
Ile Val Pro Ser Lys Thr Ala Thr Asp Ala Ile Gly Ile Pro	Arg Pro	
420	425	430
Glu Ile Thr Tyr Ala Ile Asp Asp Tyr Val Lys Arg Gly Ala	Ala His	
435	440	445
Thr Arg Glu Val Tyr Ala Thr Ala Ala Lys Val Leu Gly	Gly Thr Asp	
450	455	460
Val Val Phe Asn Asp Glu Phe Ala Pro Asn Asn His Ile Thr	Gly Ser	
465	470	475
Thr Ile Met Gly Ala Asp Ala Arg Asp Ser Val Val Asp Lys	Asp Cys	
485	490	495
Arg Thr Phe Asp His Pro Asn Leu Phe Ile Ser Ser Ser Ala	Thr Met	
500	505	510
Pro Thr Val Gly Thr Val Asn Val Thr Leu Thr Ile Ala Ala	Leu Ala	
515	520	525
Leu Arg Met Ser Asp Thr Leu Lys Lys Glu Val		
530	535	

<210> 4

<211> 27

<212> PRT

<213> Burkholderia cepacia

<400> 4

Val Arg Lys Ser Thr Leu Thr Phe Leu Ile Ala Gly Cys Leu Ala	Leu		
1	5	10	15
Pro Gly Phe Ala Arg Ala Ala Asp Ala Ala Asp			
20	25		

<210> 5

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 5

cccaagcttg ggccgatacc gatacgca

28

<210> 6

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 6

gagaagctt ccgcacggtc agacttcc

29

<210> 7

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 7

catgccatgg cacacaacga caacact

27

<210> 8

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 8

cccaagcttg ggtcagactt cttttttcag c

31

<210> 9

<211> 16

<212> PRT

9/18

<213> Burkholderia cepacia

<400> 9

Ala Asp Ala Ala Asp Pro Ala Leu Val Lys Arg Gly Glu Tyr Leu Ala
1 5 10 15

<210> 10

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:consensus

<220>

<221> UNSURE

<222> (6, 17, 18, 19, 22)

<223> Xaa=unknown

<400> 10

Ala Asp Ala Ala Asp Xaa Ala Leu Val Lys Arg Gly Glu Tyr Leu Ala
1 5 10 15
Xaa Xaa Xaa Asp Cys Xaa Ala Cys His
20 25

<210> 11

<211> 2410

<212> DNA

<213> Burkholderia cepacia

<220>

<221> CDS

<222> (673)..(1950)

<400> 11

gatggaccac ccgggcacccg gcgtgcgtt ctacgcgaac gagaagctgt ggccggccg 60
cggcccgccag gataatgacgt cgctgaicgg ttccgcgcac ggcccgttcc gcgcgaccga 120
agccgcgaag aagatccatc tgicgaacat gtccgcatc aaccaggaga cgcagaagat 180
tttcaaggcc ggcaaactga tgaagcacga ggagctcgac ggcgcagatcc ggcaccgttc 240
cgcgcgctac gtgcagttcg actgcctcca cgagattctg ccgcagcccg agaaccgcat 300
cgtgccgagc aagacggcca ccgacgcgtat cggatccccg cgcggccgaga tcacgtatgc 360
gatgcacgat tacgtgaagc gccggccgtt gcacacgcgc gaggctacg cgacggccgc 420
gaagggtgcgtg ggccggcaccg acgtgcgttt caacgacgag ttccgcgcga acaaccacat 480

10/18

cacgggcgca aggatcatgg gcgcggatgc acgcgactcg gtcgtcgaca aggactgccg 540
 cacgttcgac catccgaacc tttcccttc gaggcagctcg acgatgccga ccgtcggtac 600
 ggtgaacgtg acgcgtacga tcgcggcgct cgcgctgcgg atgtcggaca cgctgaagaa 660
 ggaagtctga cc gtg cgg aaa tct act ctc acc ttc ctc ctc gcc ggc tgc 711
 Val Arg Lys Ser Thr Leu Thr Phe Leu Leu Ala Gly Cys
 1 5 10

ctc gcg ctg ccc ggc ctc gca cgc gcg gcc gat tcg gcc gat ccg gcg 759
 Leu Ala Leu Pro Gly Leu Ala Arg Ala Ala Asp Ser Ala Asp Pro Ala
 15 20 25

cat gtc aag cgc ggc gaa tac ctc gcc gtc gcg ggc gac tgc atg gca 807
 His Val Lys Arg Gly Glu Tyr Leu Ala Val Ala Gly Asp Cys Met Ala
 30 35 40 45

tgc cac acc gcg aag ggc aag ccg ttc gcg ggc ggc ctc ggc atg 855
 Cys His Thr Ala Lys Gly Gly Lys Pro Phe Ala Gly Gly Leu Gly Met
 50 55 60

ccg gtg ccg atg ctc ggc aag atc tat acg agc aac atc aca ccg gat 903
 Pro Val Pro Met Leu Gly Lys Ile Tyr Thr Ser Asn Ile Thr Pro Asp
 65 70 75

ccc gat acc ggc atc ggc aac tgg acg ttc gag gac ttc gag cgc gcg 951
 Pro Asp Thr Gly Ile Gly Asn Trp Thr Phe Glu Asp Phe Glu Arg Ala
 80 85 90

gtg cgg cac ggc gta tcg aag aac ggc gac aac ctg tac ccg gcg atg 999
 Val Arg His Gly Val Ser Lys Asn Gly Asp Asn Leu Tyr Pro Ala Met
 95 100 105

ccg tac gtg tcg tac gcg aag atc aac gac gac gac gtg caa gcg ctg 1047
 Pro Tyr Val Ser Tyr Ala Lys Ile Asn Asp Asp Asp Val Gln Ala Leu
 110 115 120 125

tac gcg tac ttc atg cac ggc gtc gaa ccg gtc aag cag gcg ccg ccg 1095
 Tyr Ala Tyr Phe Met His Gly Val Glu Pro Val Lys Gln Ala Pro Pro
 130 135 140

aag aac gag atc ccc gcg ctg ctg agc atg cgc tgg ccg ctg aag atc 1143
 Lys Asn Glu Ile Pro Ala Leu Leu Ser Met Arg Trp Pro Leu Lys Ile
 145 150 155

tgg aac tgg ctg ttc ctg aag gac ggc gtg tac cag ccg aag ccc gag 1191
 Trp Asn Trp Leu Phe Leu Lys Asp Gly Val Tyr Gln Pro Lys Pro Glu
 160 165 170

cag agc gcc gag tgg aac cgc ggc gcc tat ctc gtg cag ggc ctc gcg 1239
 Gln Ser Ala Glu Trp Asn Arg Gly Ala Tyr Leu Val Gln Gly Leu Ala
 175 180 185

cac tgc agc acg tgc cac acg ccg cgc ggc atc gcg atg cag gag aag 1287
 His Cys Ser Thr Cys His Thr Pro Arg Gly Ile Ala Met Gln Glu Lys
 190 195 200 205

tcg ctc gac gaa acg ggc ggc agc ttc ctg tcg ggc tcg gtg ctc gcg 1335

11/18

Ser Leu Asp Glu Thr Gly Gly Ser Phe Leu Ser Gly Ser Val Val Leu Ala
 210 215 220
 ggc tgg gac ggc tac aac atc acg tcc gac ccg aac gcg ggg atc ggc 1383
 Gly Trp Asp Gly Tyr Asn Ile Thr Ser Asp Pro Asn Ala Gly Ile Gly
 225 230 235
 ggc tgg acg cag cag ctc gtc cag tac ctg cgc acc ggc agc gtg 1431
 Gly Trp Thr Gln Gln Gln Leu Val Gln Tyr Leu Arg Thr Gly Ser Val
 240 245 250
 ccg ggc ctc gcg cag gcg gcc ggc ccg atg gcc gag gcg atc gag cac 1479
 Pro Gly Leu Ala Gln Ala Ala Gly Pro Met Ala Glu Ala Ile Glu His
 255 260 265
 agc ttc tcg aag atg acc gaa gcc gac atc ggc ggc ccg atg gcc gag 1527
 Ser Phe Ser Lys Met Thr Glu Ala Asp Ile Gly Gly Pro Met Ala Glu
 270 275 280 285
 gcg atc gag cac agc ttc tcg aag atg acc gaa gcc gac atc ggc cgc 1575
 Ala Ile Glu His Ser Phe Ser Lys Met Thr Glu Ala Asp Ile Gly Arg
 290 295 300
 tcg tcg tgg ggc aag ccg gcc gag gat ggc ctg aag ctg cgc ggc gtc 1623
 Ser Ser Trp Gly Lys Pro Ala Glu Asp Gly Leu Lys Leu Arg Gly Val
 305 310 315
 gcg ctc gcg tcg tcg ggc atc gat ccg gca ccg ctg tat ctc ggc aac 1671
 Ala Leu Ala Ser Ser Gly Ile Asp Pro Ala Pro Leu Tyr Leu Gly Asn
 320 325 330
 tgc gcg acc tgc cac cag atg cag ggc aag ggc acg ccg gac ggt tac 1719
 Cys Ala Thr Cys His Gln Met Gln Gly Lys Gly Thr Pro Asp Gly Tyr
 335 340 345
 tac ccg ccg ttg ttc cac aac tcg acg gtc ggc gcg tcg aat ccg acc 1767
 Tyr Pro Pro Leu Phe His Asn Ser Thr Val Gly Ala Ser Asn Pro Thr
 350 355 360 365
 aac ctc gtg cag gtg atc ctg aac ggc gtg cag cgc aag gcc ggc agc 1815
 Asn Leu Val Gln Val Ile Leu Asn Gly Val Gln Arg Lys Ala Gly Ser
 370 375 380
 gag gac gtc ggg atg ccc gcg ttc cgc cac gag ctg tcg gat gcg cag 1863
 Glu Asp Val Gly Met Pro Ala Phe Arg His Glu Leu Ser Asp Ala Gln
 385 390 395
 atc gcc gcg ctg acg aac tac ctg acg ggg cag ttc ggc aat ccg gcc 1911
 Ile Ala Ala Leu Thr Asn Tyr Leu Thr Gly Gln Phe Gly Asn Pro Ala
 400 405 410
 gcg aag gtg acc gag cag gac gtc gcg aag ctg cgc tga aacgcggcac 1960
 Ala Lys Val Thr Glu Gln Asp Val Ala Lys Leu Arg
 415 420 425
 gcggcgaggc agggcaacaa tagaaaagag gaggagcaca gcacatcgccc cggccccca 2020
 tgccgttgt tgcaagcgg gacggcgcc gcaggcggtc gcccgtctg gtacacaggc 2080

12/18

aatccgggtgc ggcacgcgg cgcatcgtt tcgttgatcg agaccatgac accgaaccaa 2140
ccgttttcgc cgtccccagcg cgtatgtgctg ctgcgtctgt cccgaatctt gctcgatgc 2200
ctgttctgtga ttttcggctg gaagaagatt atcgacttct ccggtaacat cgcgttcatg 2260
ggcagcgagg ggcgcgcggc gccgatcata tcggccgcga tctccgtcgt gatggagctc 2320
atcgatcgaa ttgcgatctt cgtcggttcc cagacgcggc cgctcgccgt gttgttgcg 2380
ctgtiacacga tcggtaacctt catcatcgcc 2410

〈210〉 12

〈211〉 425

〈212〉 PRT

〈213〉 *Burkholderia cepacia*

<400> 12

Val	Arg	Lys	Ser	Thr	Leu	Thr	Phe	Leu	Leu	Ala	Gly	Cys	Leu	Ala	Leu
1				5					10				15		
Pro	Gly	Leu	Ala	Arg	Ala	Ala	Asp	Ser	Ala	Asp	Pro	Ala	His	Val	Lys
				20				25				30			
Arg	Gly	Glu	Tyr	Leu	Ala	Val	Ala	Gly	Asp	Cys	Met	Ala	Cys	His	Thr
				35				40			45				
Ala	Lys	Gly	Gly	Lys	Pro	Phe	Ala	Gly	Gly	Leu	Gly	Met	Pro	Val	Pro
				50			55			60					
Met	Leu	Gly	Lys	Ile	Tyr	Thr	Ser	Asn	Ile	Thr	Pro	Asp	Pro	Asp	Thr
				65		70			75			80			
Gly	Ile	Gly	Asn	Trp	Thr	Phe	Glu	Asp	Phe	Glu	Arg	Ala	Val	Arg	His
				85				90			95				
Gly	Val	Ser	Lys	Asn	Gly	Asp	Asn	Leu	Tyr	Pro	Ala	Met	Pro	Tyr	Val
				100			105			110					
Ser	Tyr	Ala	Lys	Ile	Asn	Asp	Asp	Asp	Val	Gln	Ala	Leu	Tyr	Ala	Tyr
				115			120			125					
Phe	Met	His	Gly	Val	Glu	Pro	Val	Lys	Gln	Ala	Pro	Pro	Lys	Asn	Glu
				130			135			140					
Ile	Pro	Ala	Leu	Leu	Ser	Met	Arg	Trp	Pro	Leu	Lys	Ile	Trp	Asn	Trp
				145		150			155			160			
Leu	Phe	Leu	Lys	Asp	Gly	Val	Tyr	Gln	Pro	Lys	Pro	Glu	Gln	Ser	Ala
				165			170			175					
Glu	Trp	Asn	Arg	Gly	Ala	Tyr	Leu	Val	Gln	Gly	Leu	Ala	His	Cys	Ser
				180			185			190					
Thr	Cys	His	Thr	Pro	Arg	Gly	Ile	Ala	Met	Gln	Glu	Lys	Ser	Leu	Asp
				195			200			205					
Glu	Thr	Gly	Gly	Ser	Phe	Leu	Ser	Gly	Ser	Val	Leu	Ala	Gly	Trp	Asp
				210			215			220					
Gly	Tyr	Asn	Ile	Thr	Ser	Asp	Pro	Asn	Ala	Gly	Ile	Gly	Gly	Trp	Thr
				225		230			235			240			

13/18

Gln Gln Gln Leu Val Gln Tyr Leu Arg Thr Gly Ser Val Pro Gly Leu
245 250 255
Ala Gln Ala Ala Gly Pro Met Ala Glu Ala Ile Glu His Ser Phe Ser
260 265 270
Lys Met Thr Glu Ala Asp Ile Gly Gly Pro Met Ala Glu Ala Ile Glu
275 280 285
His Ser Phe Ser Lys Met Thr Glu Ala Asp Ile Gly Arg Ser Ser Trp
290 295 300
Gly Lys Pro Ala Glu Asp Gly Leu Lys Leu Arg Gly Val Ala Leu Ala
305 310 315 320
Ser Ser Gly Ile Asp Pro Ala Pro Leu Tyr Leu Gly Asn Cys Ala Thr
325 330 335
Cys His Gln Met Gln Gly Lys Gly Thr Pro Asp Gly Tyr Tyr Pro Pro
340 345 350
Leu Phe His Asn Ser Thr Val Gly Ala Ser Asn Pro Thr Asn Leu Val
355 360 365
Gln Val Ile Leu Asn Gly Val Gln Arg Lys Ala Gly Ser Glu Asp Val
370 375 380
Gly Met Pro Ala Phe Arg His Glu Leu Ser Asp Ala Gln Ile Ala Ala
385 390 395 400
Leu Thr Asn Tyr Leu Thr Gly Gln Phe Gly Asn Pro Ala Ala Lys Val
405 410 415
Thr Glu Gln Asp Val Ala Lys Leu Arg
420 425

<210> 13

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 13

tgcaccgtgc ggaaatctac tctcact

27

<210> 14

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 14

acttcccttc tcagcgtgtc cgacatc

27

<210> 15

<211> 1441

<212> DNA

<213> Burkholderia cepacia

<220>

<221> CDS

<222> (121)..(1398)

<400> 15

tccgaacctg	ticatttcga	gcagcgcgac	gatgccgacc	gtcggtaccc	taaacgtgac	60
gctgacgatc	gccgcgcgtcg	cgctgcggat	gtcggacacag	ctgaagaagg	aagtctgacc	120
gtg cgg aaa	tct act ctc	act ttc ctc	atc gcc ggc	tgc ctc gcg	ttg	168
Val Arg Lys Ser	Thr Leu Thr	Phe Leu Ile	Ala Gly Cys	Leu Ala	Leu	
1	5	10	15			
ccg ggc ttc	gctc gcgc gccc	gat gctt	ccg gctt	ctgt gtc	aagg	216
Pro Gly Phe	Ala Arg Ala	Ala Asp	Ala Ala	Asp Pro	Ala Leu Val	Lys
20	25	30				
cgc ggc gaa	tac ctc	gctg acc	gcc atg	ccg gta	ccg atg	264
Arg Gly Glu	Tyr Leu Ala	Thr Ala Met	Pro Val	Pro Met	Leu Gly	Lys
35	40	45				
atc tac acg	agc aac	atc acg	ccc gat	ccg gat	acg ggc	312
Ile Tyr Thr	Ser Asn Ile	Thr Pro	Asp Pro	Asp Thr	Gly Asp Cys	Met
50	55	60				
gcc tgc cac	acc gtg aag	ggc ggc aag	ccg tac	gct ggc	ggc ctt ggc	360
Ala Cys His	Thr Val Lys	Gly Lys Pro	Tyr Ala	Gly Gly	Leu Gly	
65	70	75	80			
ggc atc ggc aaa	tggtt acg	tgc gag	gac ttc	gag ccgc	gctt cgg cac	408
Gly Ile Gly	Lys Trp Thr	Phe Glu Asp	Phe Glu Arg	Ala Val	Arg His	
85	90	95				
ggc gtg tcg aag	aac ggc gac	aac ctg tat	ccg gctt	atg ccg	tac gtg	456
Gly Val Ser	Lys Asn Gly	Asp Asn Leu	Tyr Pro	Ala Met	Pro Tyr	Val
100	105	110				
tcg tac gcg aag	atc aag gac	gac gac	gta cgc	gctt tac	gcc tac	504
Ser Tyr Ala	Lys Ile	Lys Asp Asp	Val Arg	Ala Leu	Tyr Ala	Tyr
115	120	125				
ttc atg cac	ggc gtc	gag ccg	atg aag	cag ccg	ccg aag	552
Phe Met His	Gly Val Glu	Pro Val Lys	Gln Ala Pro	Pro Lys	Asn Glu	
130	135	140				

15/18

atc cca gcg ctg cta agc atg cgc tgg ccg ctg aag atc tgg aac tgg	600
Ile Pro Ala Leu Leu Ser Met Arg Trp Pro Leu Lys Ile Trp Asn Trp	
145 150 155 160	
ctg ttc ctg aag gac ggc ccg tac cag ccg aag ccg tcg cag agc gcc	648
Leu Phe Leu Lys Asp Gly Pro Tyr Gln Pro Lys Pro Ser Gln Ser Ala	
165 170 175	
gaa tgg aat cgc ggc gcg tat ctg gtg cag ggt ctc gcg cac tgc agc	696
Glu Trp Asn Arg Gly Ala Tyr Leu Val Gln Gly Leu Ala His Cys Ser	
180 185 190	
acg tgc cac acg ccg cgc ggc atc gcg atg cag gag aag tcg ctc gac	744
Thr Cys His Thr Pro Arg Gly Ile Ala Met Gln Glu Lys Ser Leu Asp	
195 200 205	
gaa acc ggc ggc agc ttc ctc gcg ggg tcg gtg ctc gcc ggc tgg gac	792
Glu Thr Gly Ser Phe Leu Ala Gly Ser Val Leu Ala Gly Trp Asp	
210 215 220	
ggc tac aac atc acg tcg gac ccg aat gcg ggg atc ggc agc tgg acg	840
Gly Tyr Asn Ile Thr Ser Asp Pro Asn Ala Gly Ile Gly Ser Trp Thr	
225 230 235 240	
cag cag cag ctc gtg cag tat ttg cgc acc ggc agc gtg ccg ggc gtc	888
Gln Gln Gln Leu Val Gln Tyr Leu Arg Thr Gly Ser Val Pro Gly Val	
245 250 255	
gcg cag gcg gcc ggg ccg atg gcc gag gcg gtc gag cac agc ttc tcg	936
Ala Gln Ala Ala Gly Pro Met Ala Glu Ala Val Glu His Ser Phe Ser	
260 265 270	
aag atg acc gaa gcg gac atc ggt gcg atc gcc acg tac gtc cgc acg	984
Lys Met Thr Glu Ala Asp Ile Gly Ala Ile Ala Thr Tyr Val Arg Thr	
275 280 285	
gtg ccg gcc gtt gcc gac agc aac gcg aag cag ccg cgg tcg tcg tgg	1032
Val Pro Ala Val Ala Asp Ser Asn Ala Lys Gln Pro Arg Ser Ser Trp	
290 295 300	
ggc aag ccg gcc gag ggg ctg aag ctg cgc ggt gtc gcg ctc gcc	1080
Gly Lys Pro Ala Glu Asp Gly Leu Lys Leu Arg Gly Val Ala Leu Ala	
305 310 315 320	
tcg tcg ggc atc gat ccg gcg cgg ctg tat ctc ggc aac tgc gcg acg	1128
Ser Ser Gly Ile Asp Pro Ala Arg Leu Tyr Leu Gly Asn Cys Ala Thr	
325 330 335	
tgc cac cag atg cag ggc aag ggc acg ccg gac ggc tat tac ccg tcg	1176
Cys His Gln Met Gln Gly Lys Gly Thr Pro Asp Gly Tyr Tyr Pro Ser	
340 345 350	
ctg ttc cac aac tcc acc gtc ggc gcg tcg aat ccg tcg aac ctc gtg	1224
Leu Phe His Asn Ser Thr Val Gly Ala Ser Asn Pro Ser Asn Leu Val	
355 360 365	
cag gtg atc ctg aac ggc gtg cag cgc aag atc ggc agc gag gat atc	1272

16/18

Gln Val Ile Leu Asn Gly Val Gln Arg Lys Ile Gly Ser Glu Asp Ile
 370 375 380
 ggg atg ccc gct ttc cgc tac gat ctg aac gac gcg cag atc gcc gcg 1320
 Gly Met Pro Ala Phe Arg Tyr Asp Leu Asn Asp Ala Gln Ile Ala Ala
 385 390 395 400
 ctg acg aac tac gtg acc gcg cag ttc ggc aat ccg gcg gcg aag gtg 1368
 Leu Thr Asn Tyr Val Thr Ala Gln Phe Gly Asn Pro Ala Ala Lys Val
 405 410 415
 acg gag cag gac gtc gcg aag ctg cgc tga catagtcggg cgccgcgaca 1418
 Thr Glu Gln Asp Val Ala Lys Leu Arg
 420 425
 cggcgcaacc gataggacag gag 1441

<210> 16

<211> 425

<212> PRT

<213> Burkholderia cepacia

<400> 16

Val Arg Lys Ser Thr Leu Thr Phe Leu Ile Ala Gly Cys Leu Ala Leu
 1 5 10 15
 Pro Gly Phe Ala Arg Ala Ala Asp Ala Ala Asp Pro Ala Leu Val Lys
 20 25 30
 Arg Gly Glu Tyr Leu Ala Thr Ala Met Pro Val Pro Met Leu Gly Lys
 35 40 45
 Ile Tyr Thr Ser Asn Ile Thr Pro Asp Pro Asp Thr Gly Asp Cys Met
 50 55 60
 Ala Cys His Thr Val Lys Gly Gly Lys Pro Tyr Ala Gly Gly Leu Gly
 65 70 75 80
 Gly Ile Gly Lys Trp Thr Phe Glu Asp Phe Glu Arg Ala Val Arg His
 85 90 95
 Gly Val Ser Lys Asn Gly Asp Asn Leu Tyr Pro Ala Met Pro Tyr Val
 100 105 110
 Ser Tyr Ala Lys Ile Lys Asp Asp Asp Val Arg Ala Leu Tyr Ala Tyr
 115 120 125
 Phe Met His Gly Val Glu Pro Val Lys Gln Ala Pro Pro Lys Asn Glu
 130 135 140
 Ile Pro Ala Leu Leu Ser Met Arg Trp Pro Leu Lys Ile Trp Asn Trp
 145 150 155 160
 Leu Phe Leu Lys Asp Gly Pro Tyr Gln Pro Lys Pro Ser Gln Ser Ala
 165 170 175
 Glu Trp Asn Arg Gly Ala Tyr Leu Val Gln Gly Leu Ala His Cys Ser
 180 185 190

17/18

Thr Cys His Thr Pro Arg Gly Ile Ala Met Gln Glu Lys Ser Leu Asp
195 200 205
Glu Thr Gly Gly Ser Phe Leu Ala Gly Ser Val Leu Ala Gly Trp Asp
210 215 220
Gly Tyr Asn Ile Thr Ser Asp Pro Asn Ala Gly Ile Gly Ser Trp Thr
225 230 235 240
Gln Gln Gln Leu Val Gln Tyr Leu Arg Thr Gly Ser Val Pro Gly Val
245 250 255
Ala Gln Ala Ala Gly Pro Met Ala Glu Ala Val Glu His Ser Phe Ser
260 265 270
Lys Met Thr Glu Ala Asp Ile Gly Ala Ile Ala Thr Tyr Val Arg Thr
275 280 285
Val Pro Ala Val Ala Asp Ser Asn Ala Lys Gln Pro Arg Ser Ser Trp
290 295 300
Gly Lys Pro Ala Glu Asp Gly Leu Lys Leu Arg Gly Val Ala Leu Ala
305 310 315 320
Ser Ser Gly Ile Asp Pro Ala Arg Leu Tyr Leu Gly Asn Cys Ala Thr
325 330 335
Cys His Gln Met Gln Gly Lys Gly Thr Pro Asp Gly Tyr Tyr Pro Ser
340 345 350
Leu Phe His Asn Ser Thr Val Gly Ala Ser Asn Pro Ser Asn Leu Val
355 360 365
Gln Val Ile Leu Asn Gly Val Gln Arg Lys Ile Gly Ser Glu Asp Ile
370 375 380
Gly Met Pro Ala Phe Arg Tyr Asp Leu Asn Asp Ala Gln Ile Ala Ala
385 390 395 400
Leu Thr Asn Tyr Val Thr Ala Gln Phe Gly Asn Pro Ala Ala Lys Val
405 410 415
Thr Glu Gln Asp Val Ala Lys Leu Arg
420 425

<210> 17

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: heme binding motif

<220>

<221> UNSURE

<222> (2, 3)

<223> Xaa=unknown

<400> 17

Cys Xaa Xaa Cys His

1

5

<210> 18

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 18

catgccatgg cacacaacga caacact

27

<210> 19

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 19

cccaagcttg ggicagactt ctttcgttag c

31

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/05375

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl' C12N15/09, 9/04, 1/15, 1/19, 1/21, 5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl' C12N15/09, 9/04, 1/15, 1/19, 1/21, 5/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
BIOSIS/WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SODE, K. et al., A novel thermostable glucose dehydrogenase varying temperature properties by altering its quaternary structures Enzyme Microb.Technol., 1996, 19(2), pages 82 to 85	1-11
P, X	WO 02/36779 A1 (Koji SODE), 10 May, 2002 (10.05.02), Full text (Family: none)	1-11
A	YAMAZAKI, T. et al., Subunit analyses of a novel thermostable glucose dehydrogenase showing different temperature properties according to its quaternary structure Appl.Biochem.Biotechnol., 1999, 77-79, pages 325 to 335	1-11

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E"	earlier document but published on or after the international filing date
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&"	document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
25 June, 2003 (25.06.03)Date of mailing of the international search report
15 July, 2003 (15.07.03)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/05375

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	YAMAZAKI, T. et al., Increased thermal stability of glucose dehydrogenase by cross-linking chemical modification Biotechnol.lett., 1999, 21(3), pages 199 to 202	1-11
P,A	INOSE, K. et al., Cloning and expression of the gene encoding catalytic subunit of thermostable glucose dehydrogenase from Burkholderia cepacia in Escherichia coli Biochim.Biophys.Acta., 2003 February, 1645(2), p.133-8	1-11

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））
Int. Cl' C12N15/09, 9/04, 1/15, 1/19, 1/21, 5/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））
Int. Cl' C12N15/09, 9/04, 1/15, 1/19, 1/21, 5/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

SwissProt/PIR/GeneSeq
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
BIOSIS/WPI(DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	SODE K. et al., A novel thermostable glucose dehydrogenase varying temperature properties by altering its quaternary structures Enzyme Microb. Technol., 1996, 19(2), p. 82-85	1-11
PX	WO 02/36779 A1(早出広司)2002.05.10, 全文(ファミリーなし)	1-11

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

25. 06. 03

国際調査報告の発送日

15.07.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

本間 夏子



4B 3131

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	YAMAZAKI T. et al., Subunit analyses of a novel thermostable glucose dehydrogenase showing different temperature properties according to its quaternary structure Appl. Biochem. Biotechnol., 1999, 77-79, p. 325-335	1-11
A	YAMAZAKI T. et al., Increased thermal stability of glucose dehydrogenase by cross-linking chemical modification Biotechnol. lett., 1999, 21(3), p. 199-202	1-11
PA	INOSE K. et al., Cloning and expression of the gene encoding catalytic subunit of thermostable glucose dehydrogenase from Burkholderia cepacia in Escherichia coli Biochim. Biophys. Acta., 2003 Feb, 1645(2), p. 133-8	1-11